

Aus der Kinderklinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
(damaliger Direktor: Prof. Dr. A. Windorfer)

Untersuchungen mit einem
Screeningtest zur Erfassung
der Galaktosämie
bei Neugeborenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Gerda Lochmann
aus Winsen/Aller

1979 № 293

Aus der Kinderklinik mit Poliklinik der
Universität Erlangen-Nürnberg
(damaliger Direktor: Prof. Dr. A. Windorfer)

Untersuchungen mit einem Screening-
test zur Erfassung der Galaktosämie
bei Neugeborenen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Gerda Lochmann aus Winsen/Aller

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. F.C. Sitzmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.1979

GLIEDERUNG

1. Einleitung
 - 1.1 Physiologie und Pathologie des Galaktose-stoffwechsels
 - 1.1.2 Physiologie
 - 1.1.3 Pathologie
 - 1.2 Klinisches Bild und Therapie der Galaktosämie
 - 1.2.1 Klinisches Bild
 - 1.2.2 Therapie
2. Eigene Untersuchungen
 - 2.1 Fragestellung
 - 2.2 Probandengut
 - 2.3 Methoden zur Bestimmung des Gal-1-PUT-Mangels
 - 2.4 Biochemisches Prinzip des Screenings
 - 2.5 Arbeitsgang
 - 2.5.1 Reagentien
 - 2.5.2 Probenmaterial
 - 2.5.3 Frischblut
 - 2.5.4 Getrocknetes Blut
 - 2.5.5 Bestimmungsansatz
 - 2.5.6 Zusammenfassende Beurteilung des Tests
 - 2.6 Der UDP-Glukose-Konsumptionstest zur quantitativen Enzymbestimmung
 - 2.6.1 Durchführung des Tests
 - 2.6.2 Blutentnahme
 - 2.6.3 Hämolysatgewinnung
 - 2.6.4 Hämoglobinbestimmung

- 2.6.5 Aktivitätsbestimmung der Gal-1-PUT
- 2.6.6 Vorbereitung der 2 Reaktionssysteme
- 2.7 Ergebnisse eigener Untersuchungen
- 3. Diskussion
 - 3.1 Fehlermöglichkeiten und ihre Bewertung bei Testdurchführung mit Trockenblut
 - 3.1.1 Materialgewinnung
 - 3.1.2 Testdurchführung
 - 3.1.3 Testinterpretation
 - 3.2 Fehlermöglichkeiten bei der Testdeutung mit Frischblut
 - 3.2.1 Materialgewinnung
 - 3.2.2 Testdurchführung
 - 3.2.3 Testinterpretation
 - 3.3 Bewertung der eigenen Ergebnisse
 - 3.4 Beantwortung der Fragestellungen
- 4. Zusammenfassung
- 5. Literaturangaben
- 6. Lebenslauf

Abkürzungen

ADP bzw. ATP	= Adenosindi- bzw. -triphosphat
Gal - Glu	= Galaktose - Glukose
Gal-1-P	= Galaktose-1-phosphat
Gal-1-PUT	= Galaktose-1-phosphaturidyl- transferase
Glu-1-P/Glu-6-P	= Glukose-1- bzw. -6-phosphat
NAD	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	= reduz. Nicotinamid-adenin- dinucleotid
UDP-Gal	= Uridindiphosphatgalaktose
UDP-Glu	= Uridindiphosphatglukose
E. C.	= Enzyme Classification
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure



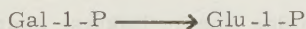
Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. EINLEITUNG

Die Galaktosämie stellt eine enzymatische Störung im Galaktosestoffwechsel dar, wobei eine Erhöhung des Galaktose- und Gal-1-P-Spiegels sowohl im Blut als auch in den verschiedenen Organen, wie Leber, Gehirn, Niere, Muskulatur, Augenlinse, Erythrozyten u.a. festzustellen ist.

Über das klinische Bild berichtete schon im Jahre 1908 erstmals von Reuss⁽⁴⁶⁾ Komrower und Schwarz⁽³⁸⁾ fanden bei der Krankheit nach ausführlichen Untersuchungen einen erhöhten Galaktose-1-Phosphat Spiegel in den Erythrozyten. Kalckar und Mitarbeitern⁽³²⁾ gelang es dann im Jahre 1956 den Zusammenhang zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und dem biochemischen Substrat, nämlich den Enzymdefekt, darzustellen und einwandfrei nachzuweisen.

Die Galaktosämie ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit, deren pathologisches Substrat der GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE-DEFEKT darstellt, jenem Ferment, das die Umwandlung



in der Leber, aber auch in geringem Maße in den Erythrozyten katalysiert.

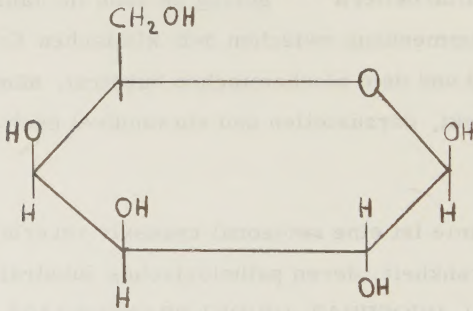
In der Literatur variieren die Angaben über die Häufigkeit homozygot Erkrankter zwischen 1 : 12 100 und 1 : 187 000 (4, 11, 26, 35, 49, 50, 55).

Die klinischen Symptome äußern sich in starkem, meist prolongiertem Ikterus, beidseitigem Katarakt, Dystrophie, Hepato-Splenomegalie und Krampfanfällen. Es gibt verschiedene Verlaufsformen, von der leichten bis zur foudroyanten, tödlich endenden (2, 13, 24, 33, 41, 48, 52).

1.1 Physiologie und Pathologie des Galaktosestoffwechsels

1.1.2 Physiologie

Galaktose stellt die 4-stereoisomere Form der Glukose mit folgender Strukturformel dar:



Sie kommt als Disaccharid im Milchzucker, in Zerebrosiden, Gangliosiden und Glykoproteinen vor, wird im Darm durch das Enzym Laktase gespalten, leicht resorbiert und fast ausschließlich in der Leber verstoffwechselt.

Der Stoffwechselweg

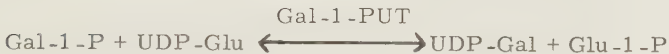


wurde in erster Linie von Leloir und seinen Mitarbeitern (13, 39) aufgeklärt. Er besteht im wesentlichen aus vier Einzelreaktionen:

- 1, Mittels Galaktokinase unter Mitwirkung von Mg^{++} , ATP läuft die erste Reaktion ab:



- 2, Dann katalysiert das Enzym Uridyltransferase (E.C. 2.7.7.12) die Reaktion



deren Gleichgewicht meist auf Seiten der UDP-Gal liegt.

- 3, UDP-Gal-4-Epimerase wandelt mit Hilfe von NAD, einer Oxydoreduktase als Wasserstoffüberträger am 4. Kohlenstoffatom UDP-Gal in UDP-Glu um.



- 4, UDP-Glu wird mit Hilfe einer Pyrophosphorylase zu Glu-1-P phosphoryliert, über Glu-6-P in den EMBDEN-MEYERHOFF-STOFFWECHSELWEG eingeschleust und zur Glykogensynthese bereitgestellt.

Das Galaktosestoffwechselschema (Abb. 1) zeigt neben dem besprochenen Leloirabbauweg auch den Umgehungsstoffwechselweg, der von de Ley und Doudoroff ⁽⁴⁰⁾ erstmals beschrieben wurde.

1.1.3 Pathologie

Man kennt zwei Störungen des Abbauweges, die klinisch unterschiedlich verlaufen:

1. Unterbrechung des 1. Schrittes durch Fehlen oder Aktivitätsminderung der Galaktokinase (E.C.2.7.1.6). Galaktose und Dulcit fallen im Blut vermehrt an, es entwickelt sich ein Galaktosediabetes mit ähnlichen Symptomen, wie bei der klassischen Galaktosämie, wobei vor allem rasch Katarakte auftreten.
2. Unterbrechung des 2. Schrittes durch Fehlen der Galaktose-1-P-Uridyltransferase (E.C.2.7.7.12) als Ursache der klassischen Galaktosämie mit unterschiedlichem Verlauf.

Fehlt nun die Galaktose-1-P-Uridyltransferase oder ist ihre Aktivität stark vermindert, so akkumulieren Galaktose-1-P, aber auch Galaktose und Dulcit (Galaktitol) in Leber, Niere, Muskulatur, Gehirn, Erythrozyten und Augenlinse. Dadurch werden Zellatmung und Transaminierungsvorgänge gehemmt und

somit die einzelnen Organe geschädigt. Folgen sind Lebercirrhose, geistige Retardierung, Katarakte und Aminoacidurie, die wie die Lebercirrhose bei frühgestellter Diagnose und rechtzeitigem Therapiebeginn reversibel sind.

Die gefürchtete Hypoglykämie wird wahrscheinlich verursacht durch den hemmenden Einfluß des Galaktose-1-Phosphats auf die Phosphoglukomutase und damit auf die Glukoseverwertung.

1.2 Klinisches Bild und Therapie der Galaktosämie

1.2.1 Klinisches Bild

Der Galaktose-1-PUT-Mangel macht sich sehr bald nach der ersten Milchfütterung bemerkbar, die Laktose (vor allem Frauenmilch) und somit Galaktose enthält. Erbrechen und Durchfälle mit nachfolgendem Gewichtsverlust, sowie Sistieren des Neugeborenen-ikterus, oft sogar Verstärkung desselben sind die ersten typischen klinischen Erscheinungsbilder. Nicht rechtzeitiges Erkennen der Frühsymptomatik verschlechtert die Prognose erheblich. Die Lebervergrößerung nimmt zu, die Kinder verfallen, verweigern jegliche Nahrung, Krampfen, entwickeln bisweilen eine schwere hämorrhagische Diathese und kommen dann häufig ad exitum unter der Verdachtsdiagnose einer Sepsis.

Bei den Überlebenden findet sich meistens eine Katarakt, geistige Retardierung war in den meisten Fällen nachweisbar. Mit zunehmendem Lebensalter wird die Galaktosetoleranz oft verbessert, da entweder Umgehungsabbauwege des normalen Leloirstoffwechsels induziert wurden, wie z.B. der Doudoroff-Weg oder aber eine Zunahme der UDP-Gal-Pyrophosphorylaseaktivität vorliegt (Siehe Abb. 1).

1.2.2 THERAPIE

Die Therapie besteht in galaktosefreier Ernährung. Bei frühzeitigem Beginn und konsequenter Durchführung gehen die klinischen Symptome schnell zurück, können ganz verschwinden und eine normale Entwicklung ohne Defektheilung ist möglich.

Als Fertignahrung auf Sojabasis aufgebaut stehen z.B. LACTOPRIV, NUTRAMIGEN, SOJABASAN, SOLATIN, u.a. zur Verfügung. Ist in einer Familie bereits ein Kind an Galaktosämie erkrankt, sollte die Mutter in der Zeit weiterer Schwangerschaften den Milchgenuß meiden, da schon intrauterin eine Schädigung möglich ist.

Eine Frühdiagnose dieses angeborenen Enzymdefekts ist also erstrebenswert, da hierdurch schwere Schädigungen der Kinder vermieden werden können.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1 FRAGESTELLUNG

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden zur Beantwortung folgender drei Fragen vorgenommen:

- 1.) Wieweit ist der Screeningtest von Beutler ^(3, 7) zum Nachweis der Galaktosämie in der Neugeborenenperiode anwendbar?
- 2.) Ist es möglich, mit Hilfe des Screenings homozygote Genträger von heterozygoten Genträgern (klinisch gesund!) zu unterscheiden?
- 3.) Gegenüberstellung von Befunden des Screenings im Rahmen dieser Untersuchungsserie mit Befunden aus früheren Genfrequenzbestimmungen (Mittels quantitativen Untersuchungsmethoden) in der gleichen Region (Einzugsgebiet der Universitäts-Kinderklinik Erlangen) ⁽³⁴⁾.

2.2 PROBANDENGUT

In der Zeit vom 4.2.1976 bis zum 3.8.1977 (also 1 1/2 Jahre lang) wurden 2494 Neugeborene mittels Screeningtest auf Galaktosämie durch Gal-1-PUT-Defekt untersucht.

Davon stammen 2464 Blutproben, auf Filterpapier getrocknet, aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen aus Nordbayern (Amberg, Ansbach, Bamberg, Erlangen, Würzburg) und 30 Proben von Säuglingen mit für Gal-1-PUT-Mangel klinisch verdächtigen Symptomen; diese Proben wurden als ACD-stabilisiertes Venenblut mit der Post zugesandt.

Die Versendung mit der Post war möglich, da auch bei Zimmertemperatur gelagerte Proben über wenigstens 10 Tage hinweg keine Aktivitätsminderung der GAL-1-PUT zeigten, wie auch Beutler nachweisen konnte.⁽⁸⁾

2.3 METHODEN ZUR BESTIMMUNG DES GAL-1-PUT-MANGELS

Zum Nachweis des Enzymdefekts wurden verschiedene Methoden entwickelt, von denen hier einige genannt werden sollen:

- 1.) Isotopenmethode mit C_1^{14} -markierter Galaktose^(42, 56)
- 2.) chromatographischer Screeningtest⁽²⁷⁾

3.) Metabolischer inhibition Screeningtest mit
Esch. coli ⁽²⁵⁾

4.) UDPG-Konsumptionstest:

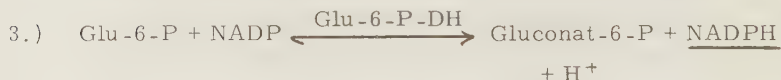
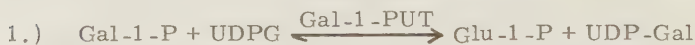
Dieser Test hat sich gut bewährt und wird deshalb
häufig zum quantitativen Nachweis angewandt ⁽⁵⁾.

5.) Screening nach Beutler:

erlaubt direkten Nachweis der Gal-1-PUT, auch
schon im Nabelschnurblut von Neugeborenen ⁽⁷⁾.

2.4 BIOCHEMISCHES PRINZIP DES SCREENINGS

Als limitierende Enzymaktivität wird die Galaktose-
1-Phosphat-Uridyltransferase gemessen:



Auf Filterpapier tritt bei Galaktosämikern die NADPH-
Fluoreszenz bei langwelligem UV-Licht (Wellenlänge
366 nm) schwach bis gar nicht auf, da das Enzym
Gal-1-PUT fehlt und die folgenden Reaktionen (2) und (3)
nicht ablaufen, da bereits Reaktion (1) gestört ist.
(Siehe Reaktion 2.4.1)

2.5 ARBEITSGANG

Das Verfahren von Beutler wurde von verschiedenen Autoren successiv verfeinert und von "Boehringer-Mannheim-GmbH" als "BM-Test Galaktosämie" auf den Markt mit folgender Arbeitsanleitung gebracht:

2.5.1 Reagentien (in der Testpackung)

Inhalt nach	Endkonzentration
Auflösen von:	im Test:
Galaktose-1-P	1,800 mM
UDPG	0,320 mM
NADP	0,660 mM
EDTA	0,135 mM
Tris (Hydroxy-methylaminomethan)	250,000 mM (pH = 8,0)

Die Lösung ist bei ca. 4⁰ C gut 4 Wochen haltbar.

2.5.2 Probematerial

2.5.3 Frischblut

2,0 ml Venenblut wird mit 0,5 ml ACD-Stabilisator abgenommen.

ACD-Stabilisator hat folgende Zusammensetzung:

Trinatriumzitatrat	: 16,0 g
Zitronensäure	: 4,7 g
Glukose	: 25,0 g
Aqua dest. ad	: 100,0 ml

2.5.4 getrocknetes Blut

Blut unmittelbar aus der Nabelschnur auf saugfähiges Papier z.B. "Guthrie-Testkarten", "Schleicher und Schnell Nr. 2992" oder Filterpapier "Whatman-Filterpapier Nr. 1" gleicher Dicke und Saugfähigkeit tropfen und eintrocknen lassen. (Bei Zimmertemperatur gut eine Woche, im Kühlschrank ca. 4 - 6 Wochen haltbar.)

Zum Ansatz für die Enzymbestimmung Blutflecken von 3 oder 5 mm Durchmesser ausstanzen (z.B. mit Papierlocher).

2.5.5 Bestimmungsansatz

In ein temperierbares Gefäß von ca. 1 - 3 ml Inhalt (Mikroreagenzglas, Mikrozentrifugenröhrchen Eppendorf) nacheinander pipettieren:

Reagenzlösung	: 0,1 ml (bestehend aus Reagentien siehe 2.5.1)
Frischblut	: 0,01 ml
oder	
1 Bluttestblättchen des Filterpapiers	: 5,0 mm Durchmesser

Reaktionsgemisch gut mischen, 2 Stunden bei 37° C im Thermoblock oder Wasserbad inkubieren. Danach 0,01 ml der Lösung auf Filterpapier z.B. "Guthrie-Testkarten" auftragen, 1 Stunde trocknen lassen und dann den Fleck im abgedunkelten Raum unter langwelligem UV-Licht von 366 nm betrachten.

Probandenblut mit normalem oder nur leicht erniedrigtem Gal-1-PUT-Spiegel wie z.B. bei der Duarte-Varian- te mit 75 % der normalen Aktivität, zeigt eine deutliche Fluoreszenz.

Die Lösungen der Blutproben, die nur schwache oder gar keine Fluoreszenz ergaben, werden weitere 1 1/2 - 2 Stunden inkubiert (nicht länger!). Nach dieser Zeit werden wieder 0,01 ml der Lösung auf eine Filterpapier- karte aufgetragen und wieder unter UV-Licht betrachtet. Hat sich die Fluoreszenz gegenüber dem ersten 2-Stun- denwert deutlich verstärkt, so handelt es sich um Blut- proben mit Aktivitätsminderung der Gal-1-PUT (evtl. wie bei Heterozygoten), Proben von Patienten ohne Gal-1-PUT-Aktivität (= Galaktosämie) zeigen auch nach 4 Stunden Inkubation noch keine Fluoreszenz; sie tritt auch später nicht mehr auf.

2.5.6 Zusammenfassende Beurteilung des Tests

- a. Bei Kindern mit normaler Enzymaktivität ist bereits nach 2 Stunden der größte Teil der Gal-1 -P umgesetzt, so daß nach dieser Zeit bei langwelligem UV-Licht starke NADPH-Fluoreszenz vorliegt, die sich vom 3 1/2 - 4 Stundenwert kaum unterscheidet.
- b. Bei heterozygoten Genträgern ist die Fluoreszenz nach 2 Stunden Inkubation im Vergleich zu den gesunden, homozygoten Genträgern stark abgeschwächt, nach 4 Stunden Inkubation wird kein oder nur ein geringer Intensitätsunterschied im Vergleich zu den Gesunden festgestellt.
- c. Bei den homozygot Erkrankten liegt weder nach 2, noch nach 4 Stunden eine Fluoreszenz vor.
- d. Da der Leerwert, der in regelmäßigen Abständen mitgeführt wurde, jedoch eine geringe Fluoreszenz zeigt, fluoreszierten auch die Blutproben von klinisch gesicherten Galaktosämikern unter UV-Licht schwach, was die Interpretation gegenüber Heterozygoten erschweren könnte.

- e. Zur Kontrolle wurden in regelmäßigen Abständen Proben eines klinisch gesicherten Galaktosämikers mitgeführt.

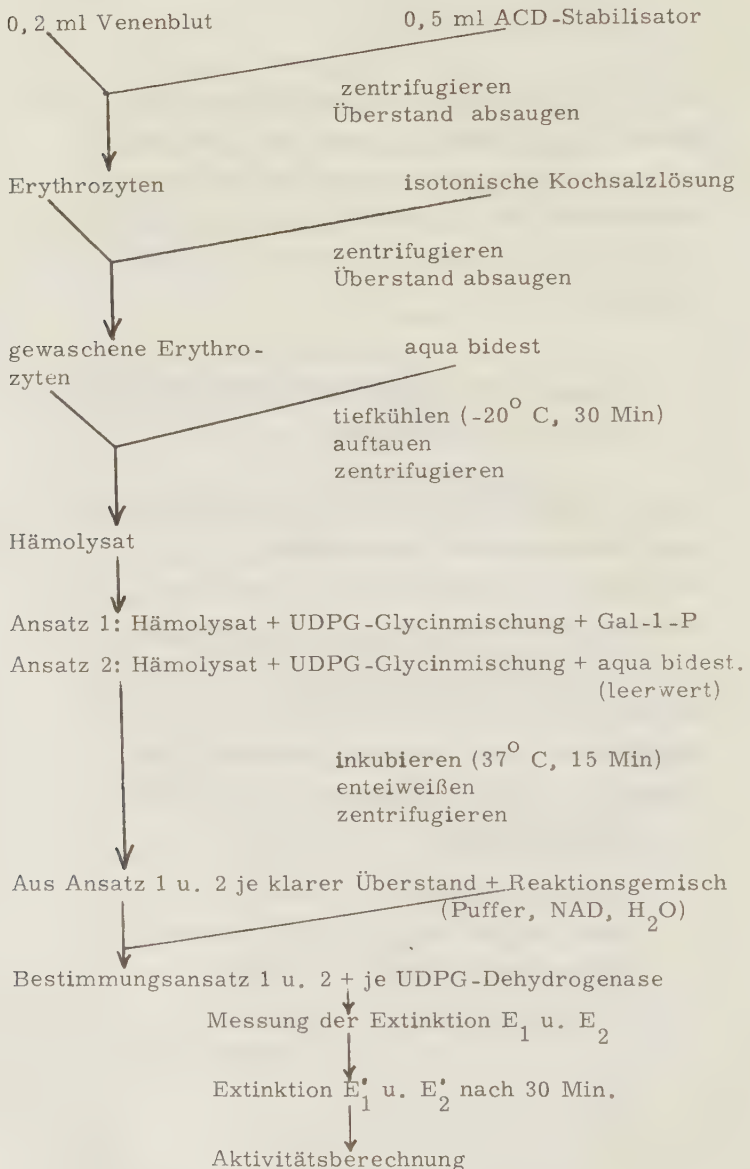
Bei den mittels Screening herausgefundenen homo- und heterozygoten Probanden wurden die Eltern benachrichtigt und dann der Screening-Test mit venösem Frischblut wiederholt, und zusätzlich mit dem UDP-Glu-Konsumptionstest die Gal-1-PUT in den Erythrozyten bestimmt.

2.6 Der UDP-Glukose-Konsumptionstest zur quantitativen Enzymbestimmung

Beutler modifizierte den Test, sodaß auch heterozygote Genträger erfaßt werden können.

Das Prinzip der Methode beruht auf Bestimmung der UDP-Glukose vor und nach einer 15-minütigen Inkubation eines Erythrozytenhämolysates mit UDP-Glu und Gal-1-P versetzt. Die Differenz der UDP-Glu-Konzentration, d.h. die in der Zeiteinheit verbrauchte Menge an UDP-Glu gilt als Maß für die Aktivität der Uridyltransferase.

e. Schematische Übersicht zum Arbeitsgang des
UDPG-Konsumptionstests



2.6.1 Durchführung des Tests

2.6.2 Blutentnahme:

1. 0,5 ml ACD-Stabilisator und 2,0 ml Venen-
blut gut mischen

oder

2. Citratblut im Verhältnis 1:9.

2.6.3 Hämolysatgewinnung

1. Von den abgesetzten Erythrozyten 0,5 ml
abpipettieren,
2. mit ungefähr 5,0 ml physiologischer Koch-
salzlösung versetzen (Waschen der Erythrozy-
ten),
3. 5 Minuten bei 2-3000 U/min. zentrifugieren,
4. den Überstand absaugen.

Die Schritte 2 - 4 dreimal wiederholen bis der Über-
stand klar ist.

5. Von den abgesetzten Erythrozyten 0,15 ml ab-
pipettieren und mit 0,6 ml aqua bidest. gut
mischen
6. so mindestens 1/2 Stunde in der Tiefkühl-
truhe einfrieren (zur Hämolyse)
7. Probe langsam auftauen lassen,
8. ca. 5 Minuten zentrifugieren bei 3000-4000 U/min
9. gewonnenes Hämolysat absondern.

2.6.4 Hämoglobinbestimmung

(nach der modifizierten Drabkinschen Methode ⁽⁴⁷⁾)

5 ml Transformationslösung:

1,0 g Na-Hydrogencarbonat	} - {	auf 100 ml
+ 0,2 g K-Ferrocyanid		aqua bidest.
+ 0,05 g K-Cyanid		auffüllen

und

0,05 ml des wie oben angegebenen gewonnenen Hämoly-
sates gut mischen und mindestens 5 Minuten später
die Extinktion im Eppendorffphotometer bei 546 nm
Wellenlänge, großer Blende (7 x 12 mm) und Makro-
küvette (d = 1 cm) gegen Wasser messen.

Die abgelesene Extinktion wird mit dem Faktor 0,148
multipliziert:

$$\text{gHb/ml} = 0,148 \times \text{Ext.}_{\text{Hb.}}$$

2.6.5 Aktivitätsbestimmung der Gal-1-PUT

Für den Untersuchungsgang wurden folgende Reagentien verwendet (Testpackung Fa. SIGMA-Biochemicals)

Glycinpuffer	: 1 M, pH = 8,7
UDPG-Na-Salz	: 25 mg in 5 ml aqua bidest.
UDPG-Glycin-Mischung	: 0,2 ml Glycinpuffer 0,05 ml UDPG-Lösung
Gal-1-P	: 30 mg in 10 ml aqua bidest.
UDPG-Dehydrogenase	: gebrauchsfertige Lösung verwenden
NAD	: 500 mg in 30 ml aqua bidest. mit NaOH auf pH = 7 einstellen, mit aqua bidest. auf 50 ml auffüllen.

2.6.6 Vorbereitung der 2 Reaktionssysteme

a. In 2 konische Pyrex-Zentrifugengefäße oder Eppendorf-mikrogefäße werden pipettiert:

Ansatz 1: 0,10 ml UDPG-Glycinmischung
0,05 ml Gal-1-P
0,10 ml Hämolytat

Ansatz 2: 0,10 ml UDPG-Glycinmischung
0,05 ml aqua bidest.
0,10 ml Hämolytat

- Beide Ansätze werden, mit der Stoppuhr gemessen, exakt 15 Minuten bei 37^o C im Wasserbad inkubiert.

Dabei läuft in Ansatz 1 folgende Reaktion ab:

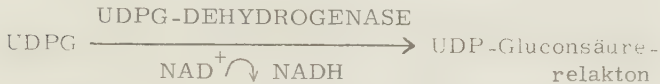


- Nach 15 Minuten beide Ansätze aus dem Wasserbad herausnehmen,
- beiden Ansätzen je 0,5 ml eiskaltes aqua dest hinzufügen, } Unterbrechung der enzymatischen Reaktion
- für 2 Minuten in kochendes Wasser stellen,
- anschließend 10 Minuten im Eisbad abkühlen lassen,
- dann 5 Minuten lang in der Mikrozentrifuge (Eppendorf-System) zentrifugieren,
- zum Schluß den Überstand zur weiteren Verwendung vom Koagulum trennen.

Durch das Kochen der Lösung wird das Enzym Gal-1-PUT denaturiert, wodurch die Reaktion in Ansatz 1 zum Stillstand kommt.

Die im Überstand verbliebene Substrat-Konzentration UDPG wird in einer weiteren Reaktion gemessen:

Durch Hinzufügen von UDP-Dehydrogenase und NAD^+ kann der Nachweis der restlichen UDP-Glukose im optischen Test nach folgendem Reaktionsprinzip erbracht werden:



Die Reduktion von NAD zu NADH kann im Eppendorff-photometer bei 366 nm gemessen werden.

b. In 2 Plastikröhrchen wird pipettiert:

Ansatz 1: 0,2 ml aus Überstand 1 (siehe unter 2.6.6)
 0,15 ml Glycinpuffer
 0,1 ml NAD
 0,45 ml aqua bidest.

Ansatz 2: 0,2 ml aus Überstand 2 (siehe unter 2.6.6)
 0,15 ml Glycinpuffer
 0,1 ml NAD
 0,45 ml aqua bidest.

c. Folgende Arbeitsgänge werden im Abstand von
 jeweils 15 sec. durchgeführt:

1.) Starten der Stoppuhr: Ansatz 1 + 0,1 ml UDPG-Dehydrogenase

- 2.) nach 15 sec.: Ansatz 2 + 0,1 ml UDPG-Dehydrogenase
- 3.) nach 30 sec.: Ansatz 1 in vorgewärmte Halbmikrovette geben
- 4.) nach 45 sec.: Ansatz 2 in vorgewärmte Halbmikrovette geben
- 5.) nach 60 sec.: Ansatz 1 Extinktion = E_1 ablesen
- 6.) nach 75 sec.: Ansatz 2 Extinktion = E_2 ablesen
- 7.) Inkubation der Ansätze 1 und 2 für 30 Minuten
- 8.) Nach dieser Zeit Messung der Endextinktion von

Ansatz 1: Endextinktion = E_1'

Ansatz 2: Endextinktion = E_2'

Gemessen wird mit einem Eppendorf-Spektrallinien-photometer bei einer Wellenlänge von 366 nm, mit großem Tubus, mittlerer Blende (2,5 x 12 mm) und einer auf 37° C vorgewärmten Halbmikroküvette (temperierbarer Küvettenhalter) von 1 cm Schichtdicke. Der Nullpunkt wird gegen Luft eingestellt.

Hat sich die ursprüngliche Menge der UDPG von Ansatz 1 gegenüber dem Leerwert von Ansatz 2 nicht verändert, so ist damit ein Gal-1-PUT-Defekt nachgewiesen.

d. Berechnung der Enzymaktivität

$$U = \frac{E_2 - E_1}{gHb/ml} \times 12,9$$

E_1 = Extinktionsdifferenz des Reaktionssystems

E_2 = Extinktionsdifferenz des Leerwertes

U = Units = Einheit der Enzymaktivität = Enzymmenge,
die in 1 Stunde bei 37° C 1 μ Mol Substrat, hier
UDPG, umsetzt;

gHb/ml = Hämoglobingehalt des Hämolysates

Faktor 12,9 berechnet sich aus:

$$12,9 = \frac{EV}{AV \cdot \xi \cdot cm} \cdot 10^6$$

$\xi = 3,3 \cdot 10^3 \mu^{-1} cm^{-1}$: Extinktionskoeffizient
für NADH bei 366 nm

EV = Endvolumen

AV = Ansatzvolumen

2.7 ERGEBNISSE EIGENER UNTERSUCHUNGEN

Mittels Screening wurden aus den 2464 Nabelschnur-blutproben 17 (0,69 %) = (1 : 145) heterozygote Probanden und 1 (0,04 %) = (1 : 2464) Homozygoter herausgefunden.

In folgender Tabelle 1 sind die Probandenzahlen pro Einzugsgebiet einer Entbindungsklinik und die mittels Screeningtest erhobenen Befunde zusammengestellt:

Tabelle 1

Frauenkliniken

	Amberg	Ansbach	Bamberg	Erlangen	Würzburg
Probanden- anzahl	595	641	877	201	150
fraglich heterozygot	5	6	6	0	0
fraglich homozygot	1	0	0	0	0

Zur Feststellung der falsch positiven und richtig positiven Befunde sollte von den 18 auffallenden Befunden der Screeningtest mit ACD-stabilisiertem Frischblut wiederholt und vor allem zusätzlich die Gal-1-PUT quantitativ bestimmt werden.

Tatsächlich konnten jedoch nur 11 der fraglich heterozygoten Genträger, sowie der fraglich Homozygote

nachuntersucht werden; die restlichen 8 Probanden folgten der Aufforderung einer weiteren Untersuchung nicht mehr.

Bei der Wiederholung des Screenings bei fraglichen Heterozygoten zeigten noch 6 eine verminderte Fluoreszenz, während der als homozygot im Screening herausgefundene Proband sich jetzt unauffällig erwies!

Beim UDPG-Konsumptionstest wurden folgende Werte ermittelt:

Tabelle 2

fraglich Heterozygot	fraglich Homozygot
1. 18,7 U/gHb	-
2. 16,5 U/gHb	-
3. 14,1 U/gHb	-
4. 7,1 U/gHb (xx)	-
5. 10,9 U/gHb	-
6. 3,6 U/gHb (xx)	-
7. 8,8 U/gHb (xx)	-
8. 5,7 U/gHb (xx)	-
9. 11,4 U/gHb	-
10. 11,4 U/gHb	-
11. 14,5 U/gHb	-
12.	13,3 U/gHb

Anmerkung:

(xx) = heterozygot

quantitativer Enzymtest wurde zweimal durchgeführt
Normalwert nach Untersuchungen von Kaloud und
Sitzmann ⁽³⁵⁾ für Säuglinge (3 Wo. - 1 Jahr):

$$18,8 \pm 7,2 \text{ U/gHb (2s)}$$

Aus der Tabelle 2 ist zu ersehen, daß von den 11
der Nachuntersuchung gefolgten Heterozygoten, die
mittels Screening 1 (d.h. Durchführung des Tests
mit getrocknetem Nabelschnurblut) entdeckt wurden,
tatsächlich nur 4 Probanden wirklich heterozygot
sind, also weniger als die Hälfte!

Diese 4 gesicherten Heterozygoten waren auch beim
Screeningtest 2 (d.h. Durchführung des Tests mit
ACD-stabilisiertem Venenblut) wiederum positiv;
beim Proband 5 könnte es sich um eine Duarte-
variante handeln, die aber nicht weiter diagnosti-
ziert werden konnte.

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse:

Tabelle 3

Proband	Zeit Tage	Screening 1 ("Trockenblut") Nabelschnurblut	Screening 2 (Frischblut) venös	Konsumptions- test (U/gHb)
1 het	8	xx		18,7
2 het	14	xx		16,5
3 het	10	xx	xx	14,1
<u>4 het</u>	30	xx	xx	7,1 (xx)
5 het	3	xx	xx	10,9
<u>6 het</u>	8	xx	xx	3,6 (xx)
<u>7 het</u>	9	xx	xx	8,8 (xx)
<u>8 het</u>	15	xx	xx	5,7 (xx)
9 het	8	xx		11,4
10 het	7	xx		11,4
11 het	9	xx		14,5
12 hom	7	0		13,3

Anmerkung zu Tabelle 3:

Tage = Zeit zwischen Blutprobenabnahme und Screening 1

(xx) = verminderte Fluoreszenz = heterozygot, d.h. im Screening fraglich heterozygot, im Konsumptions-test bewiesen heterozygot.

0 = keine Fluoreszenz = homozygot krank

Der fraglich homozygote Säugling zeigte im quantitativen Test eine normale Enzymaktivität.

Ergebnisse mit Frischblut

Bei 30 Säuglingen mit klinischen Symptomen wie Katarakt, Intelligenz- oder Gedeihstörungen, die für Galaktosämie typisch sein können, wurde der Screeningtest mit ACD-stabilisiertem Venenblut durchgeführt.

2 Probanden davon waren auch fraglich heterozygot:

Tabelle 4

Probe	Screening	quantitative Enzymbestimmung (U/gHb)
1	xx	14,7
2	xx	9,2

Probe 1 zeigte eine normale Enzymaktivität.

Probe 2 zeigte mit 9,2 U/gHb zwar eine verminderte Enzymaktivität, dieser Wert konnte aber nicht für die Katarakt auf einem Auge verantwortlich sein, denn nur bei homozygot Erkrankten sind solche manifesten Symptome zu finden, wenngleich in jüngster Zeit auch bei Heterozygoten Katarakte beschrieben wurden.

Die Katarakt ist zudem bei der Galaktosämie immer doppelseitig ausgeprägt!

Bei heterozygoten Genträgern wurde zwar vereinzelt Abneigung gegen Milch und ihre Produkte angegeben, klinisch pathologische Veränderungen fehlten aber in fast allen bisher beschriebenen Fällen.

3. DISKUSSION

Die Galaktosämie ist eine angeborene Stoffwechselkrankheit, die autosomal rezessiv vererbt wird und deren Ursache in der Inaktivität des Enzymmoleküls der Gal-1-PUT zu sehen ist.

Ein Neugeborenes mit diesem Gendefekt entwickelt bei Gabe von milchzuckerhaltiger Nahrung (wie Frauenmilch oder künstliche Milch) in den ersten Lebenstagen einen über die Norm ansteigenden Blutgalaktosespiegel, sodaß es schon innerhalb weniger Tage zu meist irreversiblen Schäden des Gehirns, der Linse und anderer Organe des Kindes kommen kann.

Deshalb ist auch für diese Stoffwechselstörung ein solches Verfahren von besonderem Interesse, mit dem der Enzymdefekt frühestmöglich zu erfassen ist. Dabei ist für die Klinik von großer Bedeutung, daß dieses Verfahren mit möglichst geringem Aufwand anwendbar ist, so daß es in Form eines Screeningtests überall eingesetzt werden kann.

Die bisher gebräuchlichen Screening-Tests benutzten als Methode die Substratmessung, also die Bestimmung der Galaktosekonzentration im Blut bzw. im Urin, wie das von Dahlquist (1969) weiterentwickelte "Testpapier für Galaktose im Urin" (18).

Es soll in dieser Diskussion auf dieses Verfahren deswegen etwas ausführlicher eingegangen werden, da dies der genaueste Screeningtest zu sein scheint, bezogen auf die Substratmessung.

Der Vorteil dieses Verfahrens (Teststreifen) liegt darin, daß alle Defekte im Galaktosestoffwechsel (Mangel oder Fehlen von: Gal-1-PUT, UDP-Gal-4-Epimerase, Galaktokinase) durch die Messung des Galaktoseanstiegs erfaßt werden und daß der Test einfach und schnell durchgeführt werden kann. Der gravierende Nachteil dieses Verfahrens aber besteht darin, daß

- a) der Enzymmangel erst dann festgestellt werden kann, wenn bereits eine Stoffwechselentgleisung stattgefunden hat (d.h. Erhöhung der Galaktosekonzentration über die Norm bereits vorliegt).
- b) der Test keine Aussage darüber macht, welches Enzym fehlt, was primär für das Kind nicht sehr wesentlich ist, da bei Verdacht sofort galaktosefrei zu ernähren ist.
- c) das "Testpapier für Galaktose im Urin" z. B. sehr empfindlich ist und auf Galaktosewerte von bereits 10 - 20 mg/dl im Urin anspricht, also auf Werte, die bei Neugeborenen keine Seltenheit sind. Daraus folgt, daß bei dieser Methode relativ häufig falsch positive Ergebnisse möglich sind, die zu weiteren Untersuchungen zwingen.

Diese Nachteile machten es wünschenswert ein Verfahren zu entwickeln, das schon kurz nach der Geburt den Enzymdefekt aufdeckt, damit nicht wertvolle Zeit bis zum Beginn der Therapie verloren geht, denn nur frühzeitige Erkennung und Behandlung der klassischen Galaktosämie (Defekt der Gal-1-PUT, aber auch der Galaktokinasedefekt) schützt den Säugling vor späteren Schäden.

Mit dem UDPG-Konsumptionstest ist zwar die Enzymaktivität der Gal-1-PUT exakt zu bestimmen, für eine Routineuntersuchung in der Neugeborenenperiode ist er aber zu aufwendig. So wurde von Beutler et al ⁽⁷⁾ ein Screeningtest entwickelt, der bereits in den Erythrozyten des Nabelschnurblutes von Neugeborenen den Enzymdefekt nachweist. Diesen Test hat "BOEHRINGER" mittlerweile als "BM-Test Galaktosämie" auf den Markt gebracht. Die Durchführung ist sehr einfach, wenig arbeitsintensiv und in jedem Labor mit geringem finanziellen Einsatz möglich. Jedoch müssen wie bei allen diesen Tests, die Fehlerquellen genau beachtet werden, weswegen im Rahmen dieser Arbeit gerade hierauf eingegangen wird.

3.1 Fehlermöglichkeiten und ihre Bewertung bei Testdurchführung mit Trockenblut

3.1.1 Materialgewinnung:

Da die Gal-1-PUT innerhalb einer Woche bei Raumtemperatur aufbewahrt nicht an Aktivität verliert, sind bei der Probengewinnung kaum Fehler zu erwarten.

Wichtig ist allerdings, daß der Blutstropfen das Filterpapier vollkommen durchtränkt und daß sich auf der Auftragseite keine Kruste bildet; nur so ist es möglich, beim Ausstanzen immer eine annähernd gleich große Erythrozytenmenge für den Bestimmungsansatz zu erhalten.

3.1.2 Testdurchführung

Die Inkubationstemperatur während des Versuchablaufs muß konstant sein, da das Enzym bei 37⁰ C sein Aktivitätsoptimum erreicht. Abweichungen nach oben und unten verlangsamen den Reaktionsablauf: beim 2-Stundenwert erscheint die Fluoreszenz vermindert, so daß der Test falsch positiv ausfallen kann und der Proband als heterozygot angesehen wird, was allerdings keine therapeutischen Folgen hätte.

3.1.3 Testinterpretation

Deutung des Testergebnisses in Bezug auf die Unterscheidung von heterozygoten und gesunden Probanden ist eines der schwierigsten Probleme dieses Tests, da die Beurteilung der Fluoreszenzintensität subjektiv vorgenommen wird.

24 Proben werden gleichzeitig im abgedunkelten Raum unter langwelligem UV-Licht betrachtet. Im Kollektiv zeigten die 2-Stundenwerte verschiedenstarke Intensitäten. Bei den 4-Stundenwerten hingegen waren diese Differenzen nicht mehr so deutlich.

Welcher Test aber als einwandfrei positiv und welcher als negativ gedeutet wird, hängt leider auch vom einzelnen Beobachter ab. Deshalb ist es ratsam, die Beobachtung möglichst immer von der gleichen Person vornehmen zu lassen.

Hier liegt sicher eine erhebliche Fehlerquelle für den Ungeübten in der Beurteilung der Testergebnisse.

3.2 Fehlermöglichkeiten bei der Testdeutung mit Frischblut

3.2.1 Materialgewinnung:

Bei vorschriftsmäßiger Einhaltung der Arbeitsanleitung treten hier kaum Fehler auf. Das Blut kann zudem ohne Aktivitätsverlust der Gal-1-PUT 1-2 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

3.2.2 Testdurchführung

Siehe Ausführung über Trockenblut 3.1.2

3.2.3 Testinterpretation

Siehe Ausführung über Trockenblut 3.1.3

3.3 Bewertung der eigenen Ergebnisse:

Der Trockenblut-Screeningtest (1) von 2464 Proben lieferte Fluoreszenzen, die 17-mal auf einen wahrscheinlich heterozygoten Probanden und einmal auf einen homozygoten Probanden schließen ließen.

Von den 18 Auffälligen konnten nur 12 weiter mit dem quantitativen Test und dem nochmaligen Screeningtest untersucht werden.

Bei der Wiederholung des Screenings (2) mit Frischblut zeigten nurmehr 6 der 11 vorher fraglich Heterozygoten eine verminderte Fluoreszenz.

Der im ersten Screeningtest als homozygot angesehene Proband dagegen war unauffällig, das heißt, er wies normale Aktivität an Gal-1-PUT auf.

Die quantitative Bestimmung der Gal-1-PUT im Konsumptionstest wies 4 von den 6 im Frischblut-screening fraglich heterozygoten Merkmalträgern als tatsächlich heterozygote Genträger aus. Die restlichen 5, die laut Trockenblutscreening (1) positiv, laut Frischblutscreening (2) aber negativ waren, zeigten bei der quantitativen Bestimmung normale Aktivität. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, daß der Screening mit Frischblut durchgeführt für Heterozygote spezifischer ist als jener mit Trockenblut, d.h. daß die Testplättchen, die mit Blut durchtränkt sind, doch schnell aufgearbeitet werden sollten (innerhalb von 2 - 3 Tagen); falls man mit dem Test auch Heterozygote erfassen will, was aber für klinische Belange und insbesondere für ein Screening auf Galaktosämie ohne Bedeutung ist.

4 tatsächlich heterozygote Genträger aus einer Stichprobe vom Umfang 2464 ergäben eine Frequenz für Heterozygote von nur

$$1 : 818 \quad (0,00122)$$

Nimmt man an, daß bei den 6 nicht untersuchten Proben das gleiche Verhältnis der Ergebnisse von Screening und quantitativem Nachweis (12 : 4) vorliegt, dann wären von insgesamt 18 fraglich positiven etwa 6 tatsächlich heterozygote Genträger. Das ent-

sprache einer Heterozygotenfrequenz von

$$1 : 412 \quad (0,00243)$$

Vergleicht man diese hier angegebenen Frequenzen mit denen in Tabelle 5 angeführten Werten, so liegt das mit diesem Screeningtest ermittelte Ergebnis weit darunter. Daraus läßt sich folgern, daß der mit Trockenblut durchgeführte Screening für heterozygote Genträger sicher nicht genügend spezifisch ist.

Eine ähnlich niedrige Heterozygotenfrequenz wie in dieser vorliegenden Arbeit weist Shih's ⁽⁵⁰⁾ Untersuchung auf, die ebenfalls mit einem Screeningtest nach Beutler ⁽⁷⁾ bei Neugeborenen durchgeführt wurde. Letztere errechnete eine Heterozygotenfrequenz von 1 : 216, allerdings indirekt aus dem Auftreten von 1 nachgewiesenen Homozygoten und einem vermuteten homozygoten Genträger (nach einer Lebenswoche verstorben) in einer Untersuchungsreihe von 374 000 Neugeborenen. Im Gegensatz zu dieser Arbeit, wollte Shih nicht an Hand der Fluoreszenz die Heterozygoten herausfinden, was sich an der Art und Weise ablesen läßt, wie sie den Screeningtest gestaltete; sie nahm nur eine Fluoreszenzmessung vor nach 3 Stunden Inkubationszeit.

Zur Erfassung der Heterozygoten mit dem Screening sei angemerkt, daß Beutler et al ⁽⁷⁾ diesen folgendermaßen durchführten:

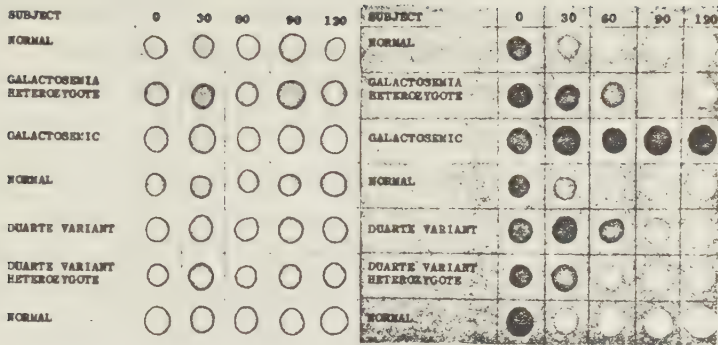
Sie entnahmen dem Ansatz bei einer Gesamtinkubationszeit von nur 2 Stunden 4 Proben im Abstand von jeweils

30 Minuten, die dann getrocknet und unter langwelligem UV-Licht im abgedunkelten Raum miteinander verglichen wurden.

Tabelle 5

Ort d. Messung (Autoren)	Jahr	Heterozygotenfrequenz	Homozygotenfrequenz	Genfrequenz
Steiermark Österreich (Kaloud/Sitzmann)	1972	1 : 55	1:12100	0,0092
Michigen (Hansen)	1964	1 : 67	1:17000	0,0075
Kopenhagen (Brand)	1967	1 : 68	1:19000	0,0074
Californien (Beutler)	1965	1 : 80	1:25000	0,0063
Wien Österreich (Thalhammer)	1968	1 : 82	1:27000	0,0061
Franken (Kaloud/Sitzmann)	1972	1 : 85	1:28900	0,0059
Manchester (Schwarz)	1968	1 : 134	1:70000	0,0037
Massachusetts (Shih)	1971	1 : 216	1:187000	0,0023

Abb. 2



(entnommen aus der Arbeit von Beutler et al ⁽⁷⁾)

Abb. 2: Die linke Hälfte der Abbildung zeigt die Photographie eines Testfilterpapiers in weißem Licht, die rechte Hälfte zeigt die Photographie des selben Filterpapiers in langwelligem UV-Licht. Es handelt sich um die von Beutler et al ⁽⁷⁾ ermittelten Ergebnisse des Fluoreszenz-Screening-Tests für Galaktosämie der inkubierten Blutproben von 3 normalen Probanden, einem Galaktosämiker, einem heterozygoten für Galaktosämie, einem homozygoten für die Duarte-Variante und einem heterozygoten für die Duarte-Variante (Duarte-Variante: Hierbei handelt es sich um Personen, die als Homozygote eine gleiche Enzymaktivität aufweisen wie die heterozygoten Merkmalsträger der klassischen Galaktosämie. Der Heterozygote produziert somit etwa $3/4$ der normalen Enzymaktivität, während der Homozygote der Duartevariante nur die Hälfte der normalen Aktivität besitzt.) (Siehe Beschriftung im Bild).

Die Zahlen in der ersten Zeile geben die Entnahmezeiten der Proben nach Inkubationsbeginn in Minuten an.

Vergleicht man in Abb. 2 die Ein-Stunden-Werte mit den 2-Stunden-Werten, so fällt auf, daß nach 1 Stunde Inkubation ein deutlicher Intensitätsunterschied der Proben vorliegt. Der Heterozygote für Galaktosämie ist sehr gut von den normalen Probanden zu unterscheiden, während die 2-Stunden-Werte diese Differenzierung nicht mehr zulassen. Laut Beutler ist es also möglich, die heterozygoten Genträger für Galaktosämie zu erfassen, indem man bereits nach einer Stunde Inkubationszeit die erste Probe entnimmt. Zieht man die 2-Stunden-Werte zur Differenzierung der Heterozygoten heran, so ergeben sich gehäuft falsch positive Ergebnisse. Diese Tatsache mag erklären, warum bei der Durchführung des Screenings nach der Arbeitsanleitung von Boehringer (d.h. also bei Probeentnahme nach 2 Stunden und nach 3 oder 3,5 Stunden) heterozygote Genträger der Galaktosämie nicht ausreichend zu differenzieren waren.

3.4 Beantwortung der Fragestellung

Die eingangs gestellten Fragen, die zur Bearbeitung dieses Themas führten, können nun folgendermaßen beantwortet werden:

ad 2.1.1 Der Screening zeigt sowohl mit Frischblut als auch mit Trockenblut durchgeführt homozygote Genträger verlässlich an.

ad 2.1.2 Homozygote Genträger sind in jedem Fall von heterozygoten und Gesunden zu unterscheiden. Der Leerwert zeigte während der gesamten Untersuchungsperiode immer eine geringe Fluoreszenz, in Folge dessen wies auch der homozygote Genträger (der als Kontrolle mitgeführt wurde) eine mäßige Fluoreszenz auf, die jedoch erheblich unter der der Heterozygoten lag. Bei dem Homozygoten war im Gegensatz zu den Heterozygoten kein Unterschied in der Fluoreszenzstärke zwischen den 2- und 4-Stunden-Werten der Inkubation.

ad 2.1.3 Da die vom Test ermittelte Heterozygotenfrequenz weit unter dem bisher mit quantitativen und auch Screeningnachweisen gefundenen Werten liegt, ist der nach der

Arbeitsanweisung von Boehringer durchgeführte Screening (also erste Probeentnahme nach 2 Stunden und zweite Probeentnahme nach 3, 5, beziehungsweise 4 Stunden Inkubation) für Heterozygote nicht spezifisch. Demnach hat eine Gegenüberstellung von Screeningbefunden mit diesem Test und früher erhobenen Befunden mittels quantitativer Enzymuntersuchungen keine verwertbare Aussagekraft (s. Tab. 5). Der Test lieferte aber für den homozygot Kranken verlässliche Ergebnisse.

Für das generelle Neugeborenen-Screening auf Galaktosämie durch Gal-1-PUT-Defekt kann dieser Test eingesetzt werden. Jedoch wird der viel seltenere Galaktokinase-Defekt damit nicht erfaßt. Dieser verursacht aber auch keine so foudroyanten Verlaufsformen wie der Gal-1-PUT-Defekt, sodaß praktisch nie eine lebensbedrohliche Situation beim Galaktokinasedefekt eintritt.

Für den klinischen Gebrauch des "BM-Test-Galaktosämie" sei angemerkt, daß der Screening mit ACD-stabilisiertem Venenblut durchgeführt für Heterozygote verlässlichere Ergebnisse bringt, als der mit Trockenblut ausgeführte Test. Heterozygote können aber mit beiden Screeningmethoden nicht sicher erfaßt werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, den von Beutler et al entwickelten Screeningtest, von Boehringer als "BM-Test-Galaktosämie" im Handel, auf seine Aussagekraft und Treffsicherheit zur Erfassung von homozygoten und heterozygoten Genträgern der Galaktosämie aufgrund eines Gal-1-PUT-Defekts bei Neugeborenen zu prüfen.

2464 Blutproben aus der Nabelschnur, aufgetragen auf Filterpapier, wurden mittels Screening untersucht. 18 Proben zeigten auffällige Fluoreszenzintensitäten, wovon eine als vermutlich von einem Homozygoten angesehen werden mußte.

Von diesen 18 Probanden folgten nur 11 der fraglich heterozygoten Genträger der Einbestellung zur Kontrolle, sowie der vermutlich Homozygote. Bei diesen wurde der Screening mit Venenblut wiederholt und anschließend mittels des UDPG-Konsumptionstests die Enzymaktivität in den Erythrozyten der gleichen Blutprobe noch zusätzlich quantitativ bestimmt.

4 Probanden waren nur nachweislich heterozygote Genträger. Der fraglich homozygote Genträger erwies sich jedoch als gesund.

Die errechnete Heterozygotenfrequenz (max. 1 : 412) liegt nach diesen Ergebnissen weit unter den in der Literatur angegebenen Werten. Daraus darf geschlossen werden, daß der mit Trockenblut durchgeführte Screening für Heterozygote nicht genug aussagekräftig ist.

Den homozygoten Genträger zeigte der Screening immer an.

Der Sinn des Screenings, nämlich die Erfassung homozygot Kranker und dann sofortige Therapie wird mit dem "BM-Test-Galaktosämie" erfüllt, so-
daß er für die tägliche Praxis in geburtshilflichen Kliniken und Kinderkliniken empfohlen werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Anderson, E.P., H.M. Kalckar, K.J. Isselbacher,
E. Kurahashi: A spezific enzymatic assay for the
diagnosis of congenital galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 50, 469 (1957)
- 2) Berger, H.: La pathogenese de la galactosemie.
J. Genet. Hum. 4, 7 (1955)
- 3) Beutler, E., Baluda, M.C., Donnel, G.N.:
A new method for the detection of galaktosemia and
its carrier state.
J. Lab. Clin. Med. 64, 694 (1964)
- 4) Beutler, E., Baluda, M.C., Sturgeon, P., Day, R.:
A new genetic abnormality resulting of galactose-
1-phosphat uridyl transferase deficiency.
Lancet 1965/I, 353
- 5) Beutler, E., Baluda, M.C.; Improved method for
measurement of galactose-1-phosphat uridyl
transferase activity of erythrocytes.
Clin. chim. acta 13, 369 (1966)
- 6) Beutler, E., Baluda, M.C., Sturgeon, P., Day, R.W.:
The genetics of galactose-1-phosphate uridyl
transferase deficiency.
J. Lab. Clin. Med. 68, 646 (1966)

- 7) Beutler, E., Baluda, M.C.: A simple spot screening test for galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 68, 137 (1966)
- 8) Beutler, E., Irwin, H.R., Blumenfeld, C.M., Goldenburg, E.W., Day, R.W.: Field test of galactosemia screening methods in newborn infants.
J. Am. Med. Ass. 199, 161 (1967)
- 9) Beutler, E.: Galactosemia
Am. J. Clin. Nutr. 21, 923 (1968)
- 10) Beutler, E., Mitchell, M.: New method for the estimation of red cell galactose-1-phosphate uridyl transferase activity.
J. Lab. Clin. Med. 72, 527 (1968)
- 11) Brand, N.J.: Frequency of heterozygotes for hereditary galactosemia in a normal population.
Acta genet. 17, 289 (1967)
- 12) Bretthauer, R.K., Hansen, R.G., Donnell, G., Bergren, W.R.: A procedure for the detecting carriers of galactosemia.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 45, 328 (1959)
- 13) Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie
De gruyter, Berlin, S. 179 (1972)

- 14) Colombo, I.P., Moser, H., Rosin, S., Richter-
rich, R., Rossi, E.: Bestimmung der Galaktose-
1-Phosphat-Uridyltransferase im Kapillarblut
bei Galaktosämie. Anwendung bei Familienunter-
suchungen.
Klin. Wschr. 43, 1074 (1965)
- 15) Cordes, F.G.: Galactosemia cataract; a Review.
Am. J. Ophth. 50, 1151 (1960)
- 16) Cuartrecasas, P., Senegal, S.: Galactose con-
version to D-xylose: an alternate route of galactose
metabolism.
Science 153, 549 (1966)
- 17) Cuartrecasas, P., Senegal, S.: The galactonic
acid pathway: a new route for galactose metabolism.
in mammals.
J. Clin. Invest. 45, 999 (1966)
- 18) Dahlquist, A.: Test paper for galactose in urine.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18, Suppl. 92, 101 (1968)
- 19) Dahlquist, A., Jagenburg, R., Mark, A.: A patient
with hereditary galactosemia studied with a screening
method for galactose in urine.
Acta paediatr. Scand. 58, 237 (1969)
- 20) Donnell, G.N., Bergren, W.R., Roldan, M.:
Genetic studies in galactosemia. The oral galac-
tose tolerance test and the heterozygous state.
Pediatrics 24, 418 (1959)

- 21) Eggermont, E., Hers, E.G.: Une nouvelle methode de detection de la galactosemie congenitae.
Clin. Chim. Acta 16, 1 (1961)
- 22) Gitzelmann, R., Hadorn, B.: Zur biochemischen Genetik der Galaktosämie
Helv. Paediat. Acta 16, 1 (1961)
- 23) Gitzelmann, R., Curtius, H.C., Schneller, I.: Galactitol and galactose-1-phosphat in the lens of a galactosemic infant.
Exp. Eye. Res. 6, 1 (1967)
- 24) Grümer, H.D.: Stoffwechselbedingte Schwachsinnformen und ihre Erkennung. II. Mitteilung: Die Galaktosämie.
Z. klin. Chem. 4, 123 (1966)
- 25) Guthrie, R.: Routine screening for inborn errors in the newborn: "Inhibition assays", "Instand bacteria" and "multiple tests".
Proc. int. Copenh. Congr. Sci. studymet.
retad. 164, II 495, (1964)
- 26) Hansen, R.G., Bretthauer, R.K., Mayer, J., Nordin, J.H.: Estimation of frequency of occurrence of galactosemia in the population.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 115, 560 (1964)
- 27) Haworth, J.C., Barchuk, N.H.: A simple chromatographic screening test for the detection of galactosemia in newborn infants.
Pediatrics. 39, 608 (1967)

- 28) Hsia, D.Y.Y., Tannenbaum, M., Schneider, J.A.,
Huang, I., Simpson, K.: Further studies on the
heterozygous carrier in galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 56, 368 (1960)
- 29) Inouye, T., Nadler, H.L., Hsia, D.Y.Y.: Galac-
tose-1-Phosphate uridylyltransferase in red and
white blood cells.
Clin. Chim. Acta 19, 169 (1968)
- 30) Isselbacher, K.J.: Evidence for an accessory
pathway of galactose metabolism.
J. Clin. Invest. 36, 920 (1957)
- 31) Kabacy, G., Hodgman, J.E., Donnell, G.N.,
Spears, R.L.: Galactose-1-phosphat uridylyltrans-
ferase levels in the newborn.
Pediatrics 38, 125 (1966)
- 32) Kalckar, H.M., Anderson, E.P., Isselbacher, K.J.:
Galactosemia, a congenital defect in a nucleotid
transferase.
Biochem. Biophys. Acta 20, 262 (1965)
- 33) Kaloud, H., Sitzmann, F.C.: Enzymopathien des
Galaktosestoffwechsels.
Verh. Dtsch. Ges. Path., 387 - 388 (1971)
- 34) Kaloud, H., Sitzmann, F.C.: Die Aktivität der
Galaktose-1-Phosphat-Uridylyltransferase in den
Erythrozyten bei Heterozygoten der Galaktosämie
in verschiedenen Altersstufen.
Pädiat. Pädolog. 6, 271 (1972)

- 35) Kaloud, H., Sitzmann, F.C.: Genfrequenz der hereditären Galaktosämie unter Berücksichtigung der Duarte-Variante.
Z. Kinderheilk. 113, 207 (1972)
- 36) Kelly, S., Katz, S., Burno, J., Baylan, J.:
Screening for galactosemia in New York State.
Public Health Reports 85, 575 (1970)
- 37) Kirkman, H.N., Maxwell, E.S., Bethesda, Sc.D.:
Enzymatic estimation of erythrocytic galactose-1-phosphate.
J. Lab. Med. 56, 161 (1960)
- 38) Komrower, G.M., Schwarz, V., Holzel, A.,
Goldberg, L.: A clinical and biochemical study of galactosemia, A possible explanation of the natur and biochemical lesion.
Arch. Dis. Childh. 31, 254 (1964)
- 39) Leloir, L.F.: The enzymatic transformation of uridine diphosphat glucose into a galactose-derivate.
Arch. Biochem. 33, 186 (1951)
- 40) Ley, de, J., Doudoroff, M.: The metabolism of D-galactose on pseudomonas saccherophila.
Biol. Chem. 227, 745 (1957)
- 41) Linneweh, F.: Erbliche Stoffwechselkrankheiten.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien (1962)

- 42) London, F., Marymont jr., J.H., Fult, J.:
A microdiffusion test for congenital galactosemia
utilizing galactose-1-C¹⁴.
Pediatrics 33, 421 (1964).
- 43) Maxwell, E.S., Kalckar, H.M., Bynum, E.:
A specific enzymatic assay for the diagnosis of
congenital galactosemia. The combined test with
4-epimerase (II).
J. Lab. Clin. Med. 50, 478 (1957).
- 44) Mathai, C.K., Beutler, E.: Electrophoretic
variation of galactose-1-phosphate uridylyltrans-
ferase.
Science 154, 1179 (1966).
- 45) Quan-Ma, R., Wells, W.W.: The distribution
of galactitol in tissues of rats fed galactose.
Biochem. Biophys. Res. Commun 20, 486 (1965).
- 46) V. Reuss, A.: Zuckerausscheidung im Säuglings-
alter.
Wien, med. Wschr. 58, 799 (1908).
- 47) Richterrich, R.: Klinische Chemie.
Akademische Verlagsges. Frankfurt/Main (1966)
- 48) Schreier, K.: Die angeborenen Stoffwechsel-
anomalien
G. Thieme, Stuttgart (1963), Neuauflage (1979).

- 49) Schwarz, V., Wells, a.R., Holzel, A., Kom-
rower, G.M., Simpson, I.M.N.: A study of the
genetics of galactosemia.
Ann. Human. Genet. (Lond.) 25, 179 (1961)
- 50) Shih, V.E., Levy, H.L., Karolkewicz, V.,
Houghton, S., Efron, M.L., Isselbacher, K.J.,
Beutler, E., Mc. Cready, R.A.: Galactosemia
screening of newborn in Massachusetts.
N. Engl. J. Med. 284, 753 (1971)
- 51) Sitzmann, F.C.: Unsere heutigen Kenntnisse über
die Galaktosämie.
Med. Klin. 63, 781 (1968)
- 52) Sitzmann, F.C., Kaloud, H.: Das Krankheitsbild
der Galaktosämie.
Klinikerzt 1, 172 (1972)
- 53) Sitzmann, F.C., Kaloud, H.: Die Varianten der
Galaktosämie.
Klinikerzt 12, 346 (1974)
- 54) Sitzmann, F.C., Kaloud, H.: Angeborene Störungen
des Galaktosestoffwechsels.
Med. Klin. 70, 491 (1975)
- 55) Thalhammer, O., Gitzelmann, R., Pantlischko, M.:
Hypergalactosemia and galactosuria due to galac-
tokinase deficiency in a new-born.
Pediatrics 42, 441 (1968)

- 56) Weinberg, A.N.: Detection of congenital galactosemia and its carrier state using Galactose-C¹⁴ and blood cells.
Metabolism 10, 728 (1961)
- 57) Wells, W.W., Pittmann, T.A., Wells, H.J., Egan, T.J.: The isolation and identification of galactitol from brains of galactosemia patients.
J. biol. Chem. 240, 1002 (1965)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Windorfer
für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im biochemischen
Labor der Uni. Kinderklinik und Herrn Prof. Dr. F.C.
Sitzmann für seine wertvolle Unterstützung.

Lebenslauf

- 2.8.1951 wurde ich, Gerda Lochmann, als Tochter des Sattlers Wilhelm Lochmann gest. 3.4.65 und dessen Ehefrau Adele, geb. Thies, gest. 30.8.67 in Winsen/Alle, geboren,
- 1958-62 besuchte ich die Volksschule in Winsen/Aller,
- 1962-70 besuchte ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasiums in Celle. Dort legte ich 1970 die Reifeprüfung ab.
- WS 1970/71 begann ich mit dem Studium Mathematik und Leibeserziehung für das höhere Lehramt an der Universität Erlangen-Nürnberg.
- WS 1971/72 nahm ich an der Universität Erlangen-Nürnberg das Medizinstudium auf.
- März 1974 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, nach 3 klinischen Semestern legte ich den 1. Teil und nach weiteren 3 Semestern den 2. Teil der ärztlichen Prüfung ab. Das Internatsjahr absolvierte ich für
4 Monate in der Med.Uni.Klinik, Erlg.,
4 Monate in der Uni.Kinderklinik Erlg.,
4 Monate in der Chir.Uni.Klinik Erlg..
- April 1978 bestand ich den 3. Teil der ärztlichen Prüfung.
- Seit 16.6.78 arbeite ich als Assistenzärztin im Städt. Krankenhaus Forchheim/Obfr. auf der Inneren Abteilung.
Erlangen, den 15.7.1979

Gerda Lochmann

